

异质生境下山东银莲花的转录组分析及 EST-SSR 分子标记开发

单筱涵, 安康, 周春霞, 张鑫, 逢玉娟, 李丽霞, 卞福花*

(烟台大学 生命科学学院, 山东 烟台 264005)

摘要: 为探究山东银莲花在全光照的山顶灌丛和阴暗的针阔混交林下两种不同生境中的生态适应机制, 并开发其 EST-SSR 分子标记, 该研究利用 Illumina 高通量测序技术对开花期的山东银莲花叶片进行转录组测序, 获取其功能注释和差异表达基因。结果表明: (1) 转录组测序共得到 53 536 条 Unigenes 序列, 其中 27 448 条成功获得注释。(2) 差异表达基因 5 635 个, 1 600 个在山顶灌丛的山东银莲花中上调表达, 其余 4 035 个下调表达。有 2 460 个差异表达基因注释到 GO 数据库 2 533 个三级条目中, 1 051 个差异表达基因注释到 KEGG 数据库的 113 条代谢通路中。(3) 山东银莲花适应于异质生境的代谢通路主要涉及光合作用-天线蛋白通路和类黄酮生物合成通路, 光合作用-天线蛋白通路中 *lhca5* 基因上调表达, *lhca1-3* 基因下调表达, 类黄酮生物合成通路中 *chs*、*c4h*、*f3'h*、*f3h*、*fls*、*ans*、*chi*、*ccoaomt* 和 *hct* 基因均上调表达。(4) 从山东银莲花转录组数据中共搜索获得 7 146 个 SSR 位点分布于 6 006 条 Unigenes 序列中, 共计 106 种重复基序, 优势重复基序为单核苷酸重复。设计合成 100 对 EST-SSR 引物中共有 68 对引物具有有效性, 其中 11 对具有多态性, 共扩增 24 个多态性片段。该研究结果有助于更深入地理解山东银莲花在不同生境中的适应性调节机制, 并首次开发其 EST-SSR 分子标记填补该方面的空白, 为该生物的保护和利用提供了重要的分子标记资源。

关键词: 异质生境, 山东银莲花, 转录组, EST-SSR, 生态适应机制

中图分类号: Q943

文献标识码: A

Transcriptome analysis and development of EST-SSR molecular markers in *Anemone shikokiana* under heterogeneous habitats

SHAN Xiaohan, AN Kang, ZHOU Chunxia, ZHANG Xin, PANG Yujuan, LI Lixia, BIAN Fuhua

(College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, Shandong, China)

Abstract: In this study, the ecological adaptation mechanisms of *Anemone shikokiana* in two distinct habitats, namely full-light hilltop scrub and shady mixed broadleaved-coniferous forest, were researched by Illumina high-throughput sequencing technology for leaves collected during the flowering stage. Moreover, EST-SSR

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31971546)。

第一作者: 单筱涵 (1998-), 硕士研究生, 主要研究方向为植物生物学, (E-mail)shanxiaohan0920@163.com。

***通信作者:** 卞福花, 博士, 教授, 研究方向为植物生物学, (E-mail)fh_bian@163.com。

molecular markers were developed based on SSR locus distribution characteristics. The results were as follows: (1) A total of 53 536 Unigenes sequences were obtained, of which 27 448 were successfully annotated. (2) 5 635 DEGs were obtained after filtering the low abundance genes, 1 600 up-regulated and 4 035 down-regulated genes comparing *A. shikokiana* in full-light hilltop scrub and in shady mixed coniferous forest. GO classification results showed that 2 460 DEGs were annotated to 2 533 tertiary entries. In addition, 1 051 DEGs were involved in 113 KEGG pathways. (3) The comprehensive analysis of the photosynthesis-antennal proteins pathway related genes revealed that the expression of *lhca5* was significantly higher, while the expression of *lhca1*, *lhca2* and *lhca3* was significantly lower. Meanwhile, the comprehensive analysis of the flavonoid biosynthesis pathway related genes revealed that the expression of *chs*, *c4h*, *f3'h*, *f3h*, *fls*, *ans*, *chi*, *coaomt* and *hct* was significantly higher. (4) A total of 6 006 unigenes containing 7 146 SSRs were identified among 53 536 unigenes by using MISA software from the transcriptome data of *A.shikokiana*. In the identified SSRs, the dominant repeat motifs were single nucleotide repeats in 106 repetitive motif types. Among the 100 pairs of EST-SSR primers, a total of 68 pairs were effective and 11 pairs with polymorphism, and 24 polymorphic fragments were amplified. Overall, in this paper, the adaptation mechanisms of *A.shikokiana* in heterogeneous habitats were analyzed at the molecular level, and for the first time EST-SSR molecular markers were developed to fill the gap in this area, which would provide important molecular marker resource for the conservation and utilization of this species.

Key words: heterogeneous habitat, *Anemone shikokiana*, transcriptome, EST-SSR, ecological adaptation mechanisms

山东银莲花 (*Anemone shikokiana*) 是毛茛科银莲花属的多年生草本植物, 间断分布于中国胶东半岛和日本四国岛 (王鸞等, 2014)。在中国被列入《世界自然保护联盟濒危物种红色名录》(IUCN) 易危 (VU) 等级, 为典型的稀有物种 (陈春利等, 2018)。其根可入药, 有清热解毒、止血除湿的功效 (刘琼, 2014); 因其株型优美、花大、花期长, 在园艺上具有潜在的开发价值 (侯元同和刘冰, 2010)。

山东银莲花生长在海拔约 600 m 以上的山顶灌丛和针阔混交林下两种异质生境中, 山东灌丛常年全光照, 土壤是以碎石、沙粒为主的砂质性土壤; 而针阔混交林下阴暗潮湿, 土壤为营养丰富且疏松的腐殖土 (Pang et al., 2020)。岳喜元等 (2023) 研究表明黄河三角洲的芦苇通过调整个体大小与叶性状适应异质生境下水分条件变化, 王妍方等 (2023) 通过木棉表型可塑性探究其适应干热河谷和热带雨林两种极端环境的机制。山东银莲花则通过改变叶片、根系的形态结构及生理等策略适应完全不同

的生长环境（于文英等，2019；Pang et al., 2020；逢玉娟等，2021）。然而，至今对该种适应异质生境的分子机制尚不清楚。植物适应环境的本质是基因特异性表达的结果，基因的特异性表达一定程度上由转录水平进行调控（张椿雨等，2007）。转录组作为特定组织或细胞在某一发育阶段或功能状态下所有 mRNA 的集合，是研究基因功能与结构的有效手段（鲁艳辉等，2021）。运用 Illumina 高通量测序技术对植物转录组进行测序分析，可高效、精准地获得大量特定组织或细胞中表达的基因序列，实现在无参考基因组的基础上进行分析（郭连安等，2021）。同时转录组分析应用于两色金鸡菊（孙浩男等，2022）、直立型扁蓊豆（乌日娜等，2022）等多种植物，且已广泛应用于探究不同生境下植物的适应性（周春苗等，2022；韦陈彬等，2022）。

分子标记可用于植物的系统进化分析、功能基因标记和分子辅助育种等，随着高通量测序技术的发展，由转录组测序得到的 EST-SSR 分子标记被作为最常用的分子标记技术之一。其操作简单，具有共显性遗传、稳定性好和准确度高优于其他分子标记的特点（岳远灏等，2022）。EST-SSR 标记开发成本低，适用于无参考基因组的物种，可有效地推动分子标记技术在植物遗传多样性分析、指纹图谱构建、种质资源保护、品种鉴定等方面的应用（杨雄等，2021），目前已在大麻（边境等，2023）、辣椒（田怀志等，2022）、枫香（李辉等，2022）等植物中开发与应用。而关于山东银莲花分子标记的报道尚不多见，未见公开报道的可利用 SSR 标记，由此使得山东银莲花在分子标记方面的研究难以深入。

本研究以异质生境下山东银莲花为研究对象，利用 Illumina 高通量测序技术获取其转录组数据，并进行组装和功能注释，得到其差异表达基因和大量丰富的 SSR 位点，随后进行 EST-SSR 引物设计并加以验证，以期探讨山东银莲花在异质生境中的生态适应机制，并开发适用的 EST-SSR 分子标记，填补山东银莲花在以上两方面的研究空白，为今后其遗传多样性分析、种质资源评价、功能基因标记和分子辅助育种等研究奠定基础，进一步实现物种保护与发展利用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用实验材料均为开花期的山东银莲花叶片，其中转录组测序材料于 2021 年 6 月取自山东省烟台市昆嵛山国家级自然保护区的泰礴顶和寒风岭（表 1），引物筛选材料于 2021 年 9 月取自青岛崂山和烟台昆嵛山（表 2）。采集后用蒸馏水清洗干净，立即放入液氮中冷冻。转录组测序由上海欧易生物医学科技有限公司完成，引物筛选材料带回实验室后采用改良的 CTAB 法^[6]提取 DNA，并利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对所提取的 DNA 进行检测，将检测合格的 DNA 统一稀释至 20 ng·μL⁻¹，放入 -20 °C 冰箱中保存备用。

表 1 用于转录组测序的山东银莲花采样信息

Table 1 The Sampling information of *Anemone shikokiana* for transcriptome sequencing

编号 Serial number	地点 Location	生境 Habitat	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude (m)	光照 Illumination (lux)	温度 Temperature (℃)
D1	烟台昆崙山泰礮顶 Yantai Kunyu Mountain Tai Bo Ding	山顶灌丛 Hilltop scrub	121°78'42.7" E	37°15'26.8" N	792.0	23 600	24.4
D2	烟台昆崙山泰礮顶 Yantai Kunyu Mountain Tai Bo Ding	山顶灌丛 Hilltop scrub	121°78'43.1" E	37°15'25.3" N	780.6	23 600	24.4
D3	烟台昆崙山泰礮顶 Yantai Kunyu Mountain Tai Bo Ding	山顶灌丛 Hilltop scrub	121°78'47.5" E	37°15'25.9" N	781.4	23 600	24.4
L1	烟台昆崙山寒风岭 Yantai Kunyu Mountain Cold Wind Ridge	针阔混交林下 Mixed broadleaved- coniferous forest	121°77'40.6" E	37°14'56.7" N	674.7	500	18.7
L2	烟台昆崙山寒风岭 Yantai Kunyu Mountain Cold Wind Ridge	针阔混交林下 Mixed broadleaved- coniferous forest	121°77'31.4" E	37°14'53.1" N	674.9	500	18.7
L3	烟台昆崙山寒风岭 Yantai Kunyu Mountain Cold Wind Ridge	针阔混交林下 Mixed broadleaved- coniferous forest	121°77'53.9" E	37°14'48.3" N	675.3	500	18.7

表 2 用于引物筛选的山东银莲花采样信息

Table 2 The Sampling information of *Anemone shikokiana* for EST-SSR molecular markers

编号 Serial number	地点 Location	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 (m) Altitude
QL2	青岛崂山滑溜口 Qingdao Laoshan Slippery Pass	120°37'50.8" E	36°11'23.6" N	962.33
YD1	烟台昆崙山泰礮顶 Yantai Kunyu Mountain Tai Bo Ding	121°46'13.1" E	37°14'51.0" N	870.00
YL1	烟台昆崙山老铁山 Yantai Kunyu Mountain Laotie Mountain	121°41'49.4" E	37°16'00.1" N	582.00
QD1	青岛崂山崂顶景区丹炉峰 Qingdao Laoshan Laodeng Scenic Area Danfeng Peak	120°37'43.3" E	36°10'39.0" N	1 019.02
QL1	青岛崂山滑溜口 Qingdao Laoshan Slippery Pass	120°37'50.8" E	36°11'23.6" N	962.33

1.2 转录组分析

De novo 拼接：使用 Trinity (Manfred G et al., 2011) 软件 paired-end 的拼接方法得到 Transcript 序列，根据序列相似性以及长度，挑选出最长的一条作为 Unigene，之后再利用 CD-HIT 软件聚类去冗余得到一套最终的 Unigene，以此作为后续分析的参考序列。

功能注释：利用 diamond (Benjamin et al., 2015) 软件将 Unigene 比对到 NR、KOG、GO、Swiss-Prot、eggNOG、KEGG 数据库以及利用 HMMER 软件比对 Pfam 数据库来进行 Unigene 的功能分析。

差异表达基因筛选：利用 DESeq (Anders S et al., 2012) 软件对各个样本基因的 counts 数目进行标准化处理，采用 BaseMean 值来估算表达量，计算差异倍数，并采用 NB (负二项分布检验的方式) 对 reads 数进行差异显著性检验，以差异倍数 $|\log_2\text{FoldChanges}|>1$ 及差异显著性检验结果 $p<0.05$ 为标准筛选差异表达基因。

1.3 引物设计与筛选

基于山东银莲花转录组测序结果，使用软件 MISA (Sebastian B et al., 2017) 进行 SSR 预测，设置重复基序的长度为 1、2、3、4、5 和 6，最小重复次数分别为 10、6、5、5、5 和 5 次；两个微卫星之间的序列长度不超过 100bp 即被认定为复合微卫星。SSR 作为一种用途广泛的分子标记，其多态性水平越高则应用价值越大 (郑燕等, 2012)。当 SSR 长度 ≥ 20 bp 时可显示出较高的多态性，长度在 12~20 bp 之间相对较低，在 12 bp 以下则很低 (Temnykh et al., 2001)。根据 SSR 长度 ≥ 20 bp、去除复合型 SSR 位点和容易与多腺苷化作用相混杂的 A/T 重复基序的原则将所有 SSR 位点进行初步筛选后随机选择 100 对 SSR 位点利用软件 Primer3 (Rozen S & Skaletsky H, 2000) 进行引物设计，命名为 ANS001-ANS100，送至北京六合华大基因科技有限公司合成。

利用青岛崂山滑溜口所采集样品通过 1%琼脂糖凝胶电泳对 100 对引物进行筛选，以检测引物有效性。PCR 扩增体系为 20 μL ：2 \times Master Mix 4 μL 、上下游引物 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 2 μL 、DNA 模板 2 μL 和 dd H₂O 10 μL 。反应程序：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。随后将无法正确扩增或扩增产物大小与预期不符的引物剔除，可正确扩增的引物利用样品 YD1 (烟台昆嵛山泰礴顶)、YL1 (烟台昆嵛山老铁山)、QD1 (青岛崂山崂山景区丹炉峰附近)、QL1 (青岛崂山滑溜口) 通过 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染显色的方法进行目的条带的分离和检测，筛选出具有多态性的 EST-SSR 引物。

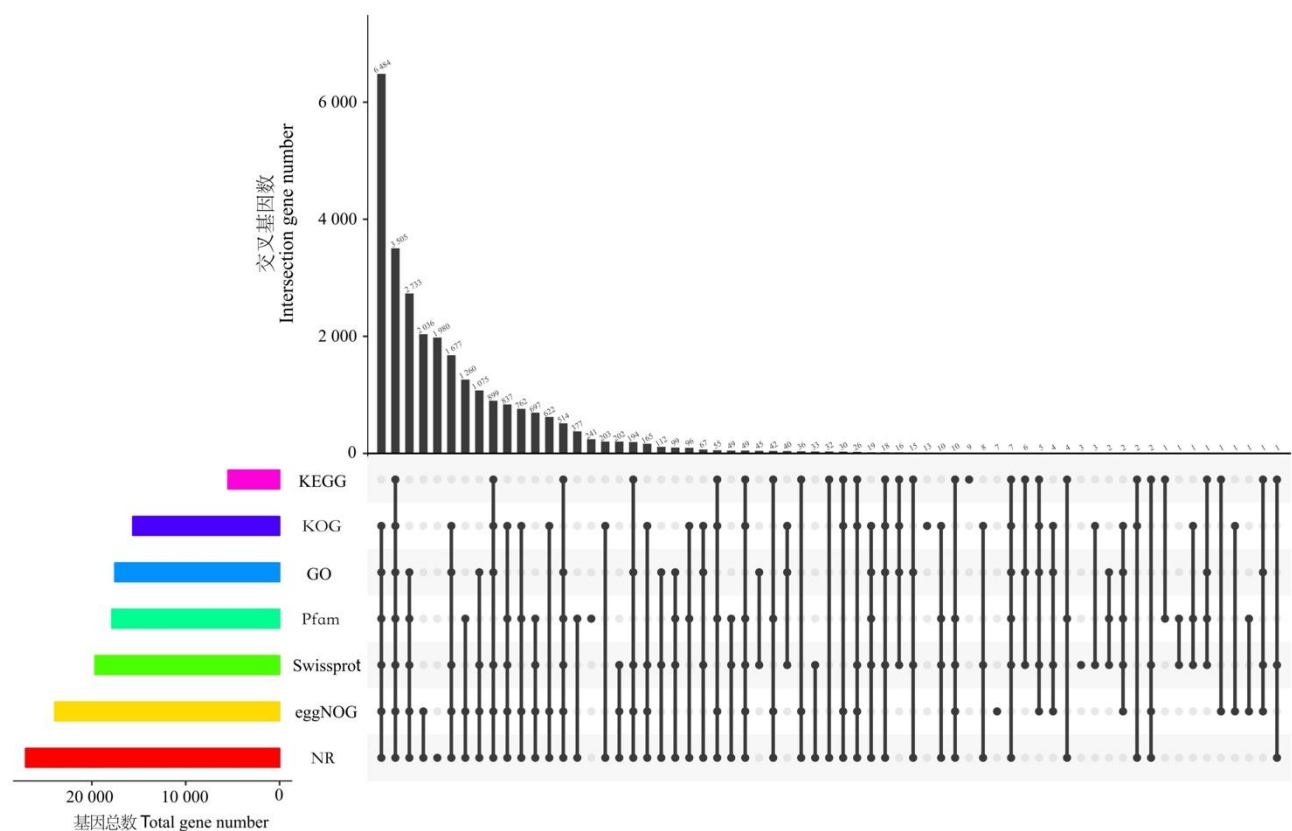
2 结果与分析

2.1 转录组数据分析

2.1.1 总体特征 对山东银莲花进行无参转录组分析，共获得 42.34 G 的 Clean Data，各样本的有效数据量分布在 6.98~7.10 G，Q30 碱基分布在 93.68%~94.20%之间，证明本次测序数据准确性良好，可用于后续分析。利用 De novo 拼接出 Unigene 53 536 条，总长度为 57 909 453 bp，最长 Unigene 为 15 502 bp，最短 Unigene 为 301 bp，平均长度为 1 081.69 bp。用皮尔逊相关系数表示 D 和 L 样品间基因表达水平相关性 (低于 0.8 表示相关性较差)，D 组间生物学重复的相关性均大于 0.868 9，L 组间生物学重复之间相关性均大于 0.831 8，表明样品组间相关性较高，可以此作为后续分析的参考序列。

2.1.2 功能注释 对拼接组装的 53 536 条 Unigenes 进行常见功能数据库注释，在 7 个数据库中均注释成功

的 Unigenes 有 3 505 条，占总数的 6.55%，至少在 1 个数据库中注释成功的 Unigenes 有 27 448 条，占总数的 51.27%（图 1）。在 NR 数据库中成功注释的条数最多，共有 27 044 条，占总数的 50.52%，其余分别为 eggNOG 库（23 934，44.71%）、Swissprot 库（19 637，36.68%）、Pfam 库（17 859，33.36%）、GO 库（17 540，32.76%）、KOG 库（5 481，29.19%）和 KEGG 库（5 481，10.24%）。按照 NR 数据库中山东银莲花的 Unigenes 与其他物种匹配可得，相似程度最高的物种为耧斗菜 (*Aquilegia coerulea*，56.72%)，其次按匹配度由高到低依次为博落回(*Macleaya cordata*，6.08%)、鸦片罂粟(*Papaver somniferum*，4.06%)、莲(*Nelumbo nucifera*，3.29%)、葡萄(*Vitis vinifera*，1.92%)、欧洲栓皮栎(*Quercus suber*，0.94%)、月季花(*Rosa chinensis*，0.9%)、Sphaerulina musiva SO2202（0.73%）、中华猕猴桃(*Actinidia chinensis* var. *chinensis*，0.58%)、向日葵(*Helianthus annuus*，0.55%)和其他物种（24.24%）。



上方条形图的数字代表下方矩阵中对应加黑点的数据库交集的结果，左侧柱状图代表各数据库全部注释到基因数量。
The numbers in the top bar represent the results of the intersection of the databases corresponding to the black dots in the matrix below, and the bars on the left represent the number of genes annotated to each database.

图 1 各数据库注释韦恩图

Fig. 1 Venn diagram for each database annotation

2.2 差异表达 Unigene 分析

2.2.1 差异表达 Unigene 筛选 对山东银莲花的转录组数据进行筛选，共挖掘差异表达 Unigene 5 635 个，数量较多，其中与林下（L）的山东银莲花相比，山顶（D）的山东银莲花中有上调基因 1 600 个，下

调基因 4 035 个（图 2），说明不同生长环境对山东银莲花基因表达影响较大。

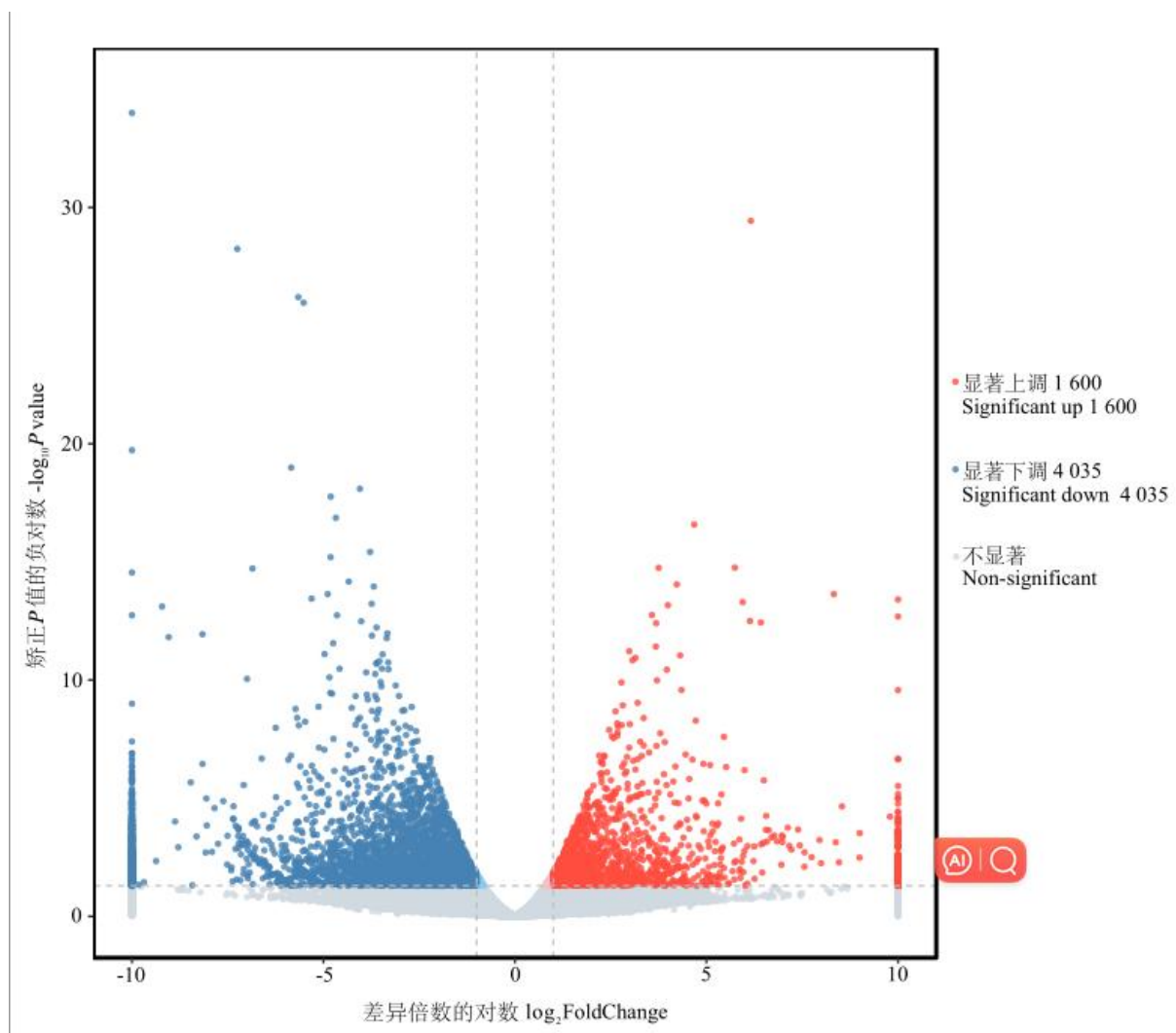


图 2 差异表达基因的火山图

Fig. 2 Volcano map of differentially expressed genes

2.2.2 差异表达 Unigene 富集分析 将山东银莲花的差异表达 Unigene 进行 GO（图 3）和 KEGG 富集分析（图 4），结果显示共有 2 460 个差异表达基因被注释到 GO 数据库 2 533 个三级条目中，共有 1 051 个差异表达基因被注释到 KEGG 数据库的 113 条代谢通路中。

根据 GO 数据库一级条目生物学过程(biological process, BP)、细胞成分(cell component, CC)和分子功能(molecular function, MF)的不同，筛选三种分类中对应差异基因数目大于 2 的 GO 二级条目，按照每个条目对应的 P 值由小到大排序可得前 10 个富集分类，山东银莲花的差异表达基因主要显著富集在脱落酸代谢过程（abscisic acid metabolic process GO:0009687）、薄荷醇生物合成过程（menthol biosynthetic process GO:0031525）、硫脂生物合成过程（sulfolipid biosynthetic process GO:0046506）等生物学过程中，胞质大核糖体亚基（cytosolic large ribosomal subunit GO:0022625）、胞质小核糖体亚基

（cytosolic small ribosomal subunit GO:0022627）、核糖体（Ribosome GO:0005840）等细胞成分中，芳醇脱氢酶（NADP+）活性[aryl-alcohol dehydrogenase (NADP+) activity GO:0047681]、异戊烯醇脱氢酶活性（isopiperitenol dehydrogenase activity GO:0018458）、卡维醇脱氢酶活性（carveol dehydrogenase activity GO:0018459）等分子功能中。

将山东银莲花的差异表达基因比对到 KEGG 数据库的参考代谢通路中，可划分到 6 个类别中，其中与代谢相关通路的 Unigenes 数量最多，有 480 个，占比 45.67%；其次遗传信息加工相关通路的 Unigenes 有 425 个，占比 40.44%；与环境信息处理相关通路的 Unigenes 有 58 个，占比 5.52%；与生物系统相关通路的 Unigenes 有 50 个，占比 4.76%；与细胞过程相关通路的 Unigenes 有 37 个，占比 3.52%。共有 10 条 KEGG 通路达到极显著水平（ $P < 0.01$ ），分别为核糖体(ribosome ko03010)、光合作用-天线蛋白(photosynthesis - antenna proteins ko00196)、类黄酮生物合成(flavonoid biosynthesis ko00941)、倍半萜和三萜生物合成(sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis ko00909)、酮体的合成与降解(synthesis and degradation of ketone bodies ko00072)、谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism ko00480)、植物-病原互作(plant-pathogen interaction ko04626)、MAPK 信号通路-植物(MAPK signaling pathway - plant ko04016)、黄酮和黄酮醇的生物合成(flavone and flavonol biosynthesis ko00944)、二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜辣素的生物合成(stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis ko00945)。

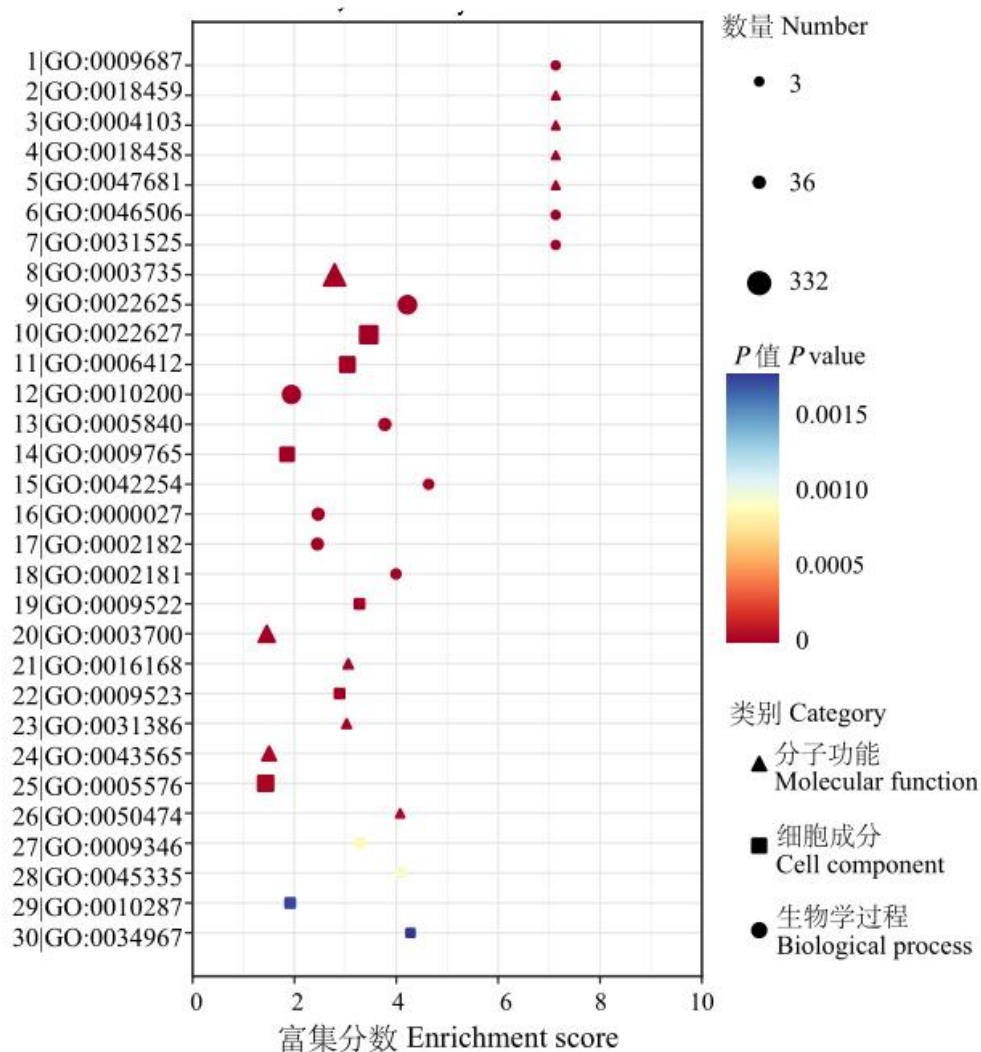


图 3 差异表达基因 GO 富集 Top30 气泡图

Fig. 3 GO enrichment of differentially expressed genes in the Top30

1、脱落酸代谢过程；2、香芹醇脱氢酶活性；3、胆碱激酶活性；4、异哌啶醇脱氢酶活性；5、芳基醇脱氢酶(NADP+)活性；6、硫脂生物合成过程；7、薄荷醇生物合成过程；8、核糖体的结构成分；9、细胞质翻译；10、细胞质大核糖体亚基；11、细胞质小核糖体亚基；12、翻译；13、对几丁质的反应；14、核糖体；15、光合作用，光收集；16、核糖体生物发生；17、核糖体大亚基组装；18、细胞质翻译延伸；19、photosystem；20、DNA 结合转录因子活性；21、叶绿素结合；22、光系统；23、蛋白质标签；24、序列特异性 DNA 结合；25、细胞外区域；26、(S)-去甲古柯碱合成酶活性；27、柠檬酸裂解酶复合物；28、吞噬泡；29、plastoglobule；30、Set3 复合物。

1. Abscissic acid metabolic process; 2. Carveol dehydrogenase activity; 3. Choline kinase activity; 4. Isopiperitenol dehydrogenase activity; 5. Aryl-alcohol dehydrogenase(NADP+) activity; 6. Sulfolipid biosynthetic process; 7. Menthol biosynthetic process; 8. Structural constituent of ribosome; 9. Cytoplasmic translation; 10. Cytosolic large ribosomal subunit; 11. Cytosolic small ribosomal subunit; 12. Translation; 13. Response to chitin; 14. Ribosome; 15. Photosynthesis, light harvesting; 16. Ribosome biogenesis; 17. Ribosomal large subunit assembly; 18. Cytoplasmic translational elongation; 19. Photosystem; 20. DNA-binding transcription factor activity; 21. Chlorophyll binding; 22. Photosystem; 23. Protein tag; 24. Sequence-specific DNA binding; 25. Extracellular region; 26. (S)-norcoclaurine synthase activity; 27. Citrate lyase complex; 28. Phagocytic vesicle; 29. Plastoglobule; 30. Set3 complex.

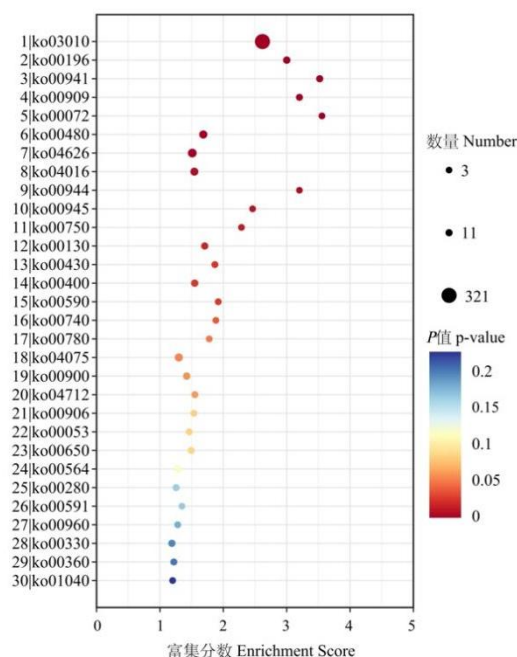


图 4 差异表达基因 KEGG 富集 Top30 气泡图

Fig. 4 KEGG enrichment of differentially expressed genes in the Top30

1、核糖体；2、光合作用-触角蛋白；3、黄酮类化合物的生物合成；4、倍半萜和三萜类化合物的生物合成；5、酮体的合成和降解；6、谷胱甘肽代谢；7、植物与病原体的相互作用；8、MAPK 信号通路-植物；9、黄酮和黄酮醇的生物合成；10、二苯乙烯类、二芳基庚烷类和姜酚的生物合成；11、维生素 B6 代谢；12、泛醌和其他萜类-泛醌的生物合成；13、牛磺酸和低牛磺酸代谢；14、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成；15、花生四烯酸代谢；16、核黄素代谢；17、生物素代谢；18、植物激素信号转导；19、萜类化合物骨架的生物合成；20、昼夜节律-植物；21、类胡萝卜素的生物合成；22、抗坏血酸和醛酸代谢；23、丁酸盐代谢；24、甘油磷脂代谢；25、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解；26、亚油酸代谢；27、丙烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成；28、精氨酸和脯氨酸代谢；29、苯丙氨酸的代谢；30、不饱和脂肪酸的生物合成。

1. Ribosome; 2. Photosynthesis-antenna proteins; 3. Flavonoid biosynthesis; 4. Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis; 5. Synthesis and degradation of ketonebodies; 6. Glutathionemetabolism; 7. Plant-pathogen interaction; 8. MAPK signaling pathway-plant; 9. Flavone and flavonol biosynthesis; 10. Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis; 11. Vitamin B6 metabolism; 12. Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis; 13. Taurine and hypotaurine metabolism; 14. Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis; 15. Arachidonic acid metabolism; 16. Riboflavin metabolism; 17. Biotin metabolism; 18. Plant hormone signal transduction; 19. Terpenoid backbone biosynthesis; 20. Circadian rhythm-plant; 21. Carotenoid biosynthesis; 22. Ascorbate and aldarate metabolism; 23. Butanoate metabolism; 24. Glycerophospholipid metabolism; 25. Valine,leucine and isoleucine degradation; 26. Linoleic acid metabolism; 27. Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis; 28. Arginine and proline metabolism; 29. Phenylalanine metabolism; 30. Biosynthesis of unsaturated fatty acids.

2.2.3 关键差异表达 Unigene 信息 从众多通路中筛选出与山东银莲花适应于异质生境的主要通路（表 3），其中 15 个差异表达 Unigene 属于光合作用-天线蛋白（photosynthesis - antenna proteins）通路，分别为 1 个上调基因 *lhca5*（light-harvesting complex I chlorophyll a/b binding protein 5）、7 个下调基因 *lhcb1*（light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 1）、6 个下调基因 *lhcb2*（light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 2）、1 个下调基因 *lhcb3*（light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 3）；11 个差异表达 Unigene 属于类黄酮生物合成（flavonoid biosynthesis）

通路，分别为 1 个 *chs* (chalcone synthase)、1 个 *c4h* (trans-cinnamate 4-monooxygenase)、2 个 *f3'h* (flavonoid 3'-monooxygenase)、1 个 *f3h* (naringenin 3-dioxygenase)、1 个 *fls* (flavonol synthase)、1 个 *ans* (anthocyanidin synthase)、1 个 *chi* (chalcone isomerase)、1 个 *ccoaomt* (caffeoyl-CoA O-methyltransferase)、2 个 *hct* (shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase)，以上基因皆为上调表达。

表 3 山东银莲花适应于异质生境的差异表达基因分析

Table 3 Analysis of differentially expressed genes in *Anemone shikokiana* adapted to heterogeneous habitats

代谢通路 Metabolic pathway	通路 Pathway	基因 Gene	基因编号 Gene ID	log ₂ FoldChange
光合作用-天线蛋白 Photosynthesis-antenna proteins ko00196	K08911	<i>lhca5</i>	TRINITY_DN9194_c0_g1_i1_1	1.032205465
			TRINITY_DN24746_c3_g3_i3_2	-1.12845721
			TRINITY_DN21766_c2_g7_i1_1	-1.721035581
			TRINITY_DN24746_c3_g2_i3_2	-1.952942905
	K08912	<i>lhcb1</i>	TRINITY_DN37231_c0_g1_i1_2	-3.843048888
			TRINITY_DN21766_c2_g2_i2_1	-4.048259712
			TRINITY_DN25762_c3_g1_i5_2	-5.656930902
			TRINITY_DN24746_c3_g12_i1_2	-5.51632584
	K08193	<i>lhcb2</i>	TRINITY_DN24815_c0_g2_i1_2	-1.900257362
			TRINITY_DN22809_c2_g1_i13_1	-1.941378951
			TRINITY_DN23990_c2_g1_i4_2	-2.243240333
			TRINITY_DN24319_c0_g1_i4_2	-2.732165837
	K08194	<i>lhcb3</i>	TRINITY_DN24815_c0_g1_i1_2	-1.242203266
			TRINITY_DN21916_c4_g3_i1_1	-1.545454537
			TRINITY_DN24021_c0_g1_i1_2	-1.237597641
			TRINITY_DN16756_c0_g1_i1_1	5.944109472
类黄酮生物合成 Flavonoid biosynthesis ko00941	K00660	<i>chs</i>	TRINITY_DN16756_c0_g1_i1_1	5.944109472
	K00487	<i>c4h</i>	TRINITY_DN17787_c0_g1_i1_2	2.458589689
	K05280	<i>f3'h</i>	TRINITY_DN23510_c2_g3_i1_1	8.323553071
			TRINITY_DN23510_c2_g4_i10_1	1.523967569
	K00475	<i>f3h</i>	TRINITY_DN9341_c0_g1_i1_2	2.813458873
	K05278	<i>fls</i>	TRINITY_DN5340_c0_g1_i1_2	2.669799151
	K05277	<i>ans</i>	TRINITY_DN30744_c0_g1_i1_1	2.54154359
	K01859	<i>chi</i>	TRINITY_DN25718_c0_g1_i1_1	4.311335927
	K00588	<i>ccoaomt</i>	TRINITY_DN20298_c0_g1_i1_1	2.677118483
	K13065	<i>hct</i>	TRINITY_DN23267_c0_g2_i2_1	2.292870935
			TRINITY_DN21518_c0_g1_i1_1	1.070509174

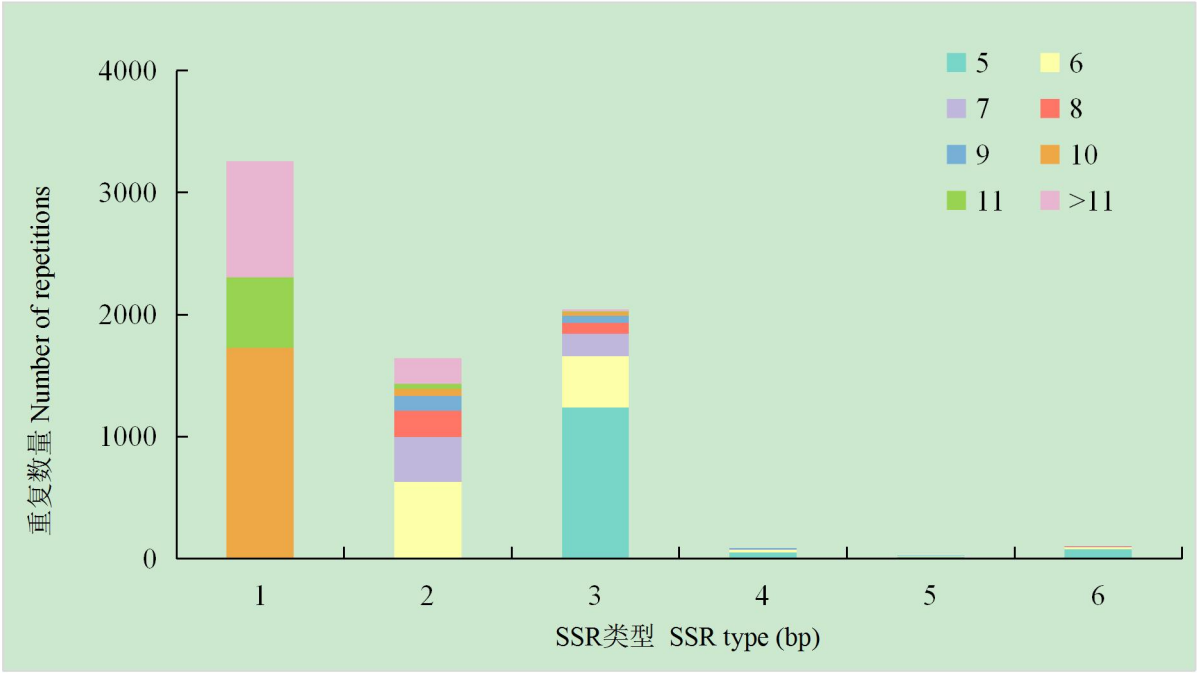
2.3 SSR 位点分析与引物开发

2.3.1 SSR 位点总体特点 对山东银莲花转录组的 53 536 条 Unigenes 序列进行搜索，共检出 6 006 条 Unigenes 序列中含有 7 146 个 SSR 位点，平均分布距离为 8.1 kb，SSR 长度在 10~225 bp 之间，SSR 出现频率 (=SSR 个数/总 Unigene 数) 为 13.35%，SSR 发生频率 (=含 SSR 的 Unigene 数/总 Unigene 数) 为 11.22%。山东银莲花含有 2 个及以上的 SSR 位点的序列有 907 条，占全部序列的 1.68%，含有复杂

重复类型的 SSR 位点的序列有 420 条，占全部序列的 0.78%。山东银莲花 SSR 类型较为丰富，共计 106 种重复基序（表 4），优势重复基序为单核苷酸重复（3 248，45.59%），其次分别为三核苷酸重复（2 041，28.56%）、二核苷酸重复（1 645，23.02%）、六核苷酸重复（101，1.41%）、四核苷酸重复（81，1.13%）、五核苷酸重复（20，0.28%）（图 5）。

表 4 山东银莲花中不同 SSR 重复基序的出现频率
Table 4 Frequency of different SSR repeat motifs in *Anemone shikokiana*

SSR 类型 SSR type	重复基序种类数 Number of repeat motif types	重复基序类型 Repeat motif type	数量 Number	发生频率 Frequency of occurrence (%)
单核苷酸 Mono-nucleotide	2	A/T	3208	44.89
		C/G	50	0.70
	二核苷酸 Di-nucleotide	4	AG/CT	927
AC/GT			385	5.39
AT/AT			328	4.59
CG/CG			5	0.07
AAG/CTT			648	9.07
ATC/ATG			338	4.73
ACC/GGT			307	4.30
AAC/GTT			205	2.87
三核苷酸 Tri-nucleotide	10	AGC/CTG	188	2.63
		AAT/ATT	168	2.35
		AGG/CCT	91	1.27
		ACT/AGT	39	0.55
		CCG/CGG	33	0.46
		ACG/CGT	24	0.34
		AAAT/ATTT	37	0.52
		AAAC/GTTT	10	0.14
		ACAT/ATGT	7	0.10
		其他 Others	27	0.38
四核苷酸 Tetra-nucleotide	17	AGAGG/CCTCT	4	0.06
		AAAAC/GTTTT	3	0.04
		AAAAT/ATTTT	3	0.04
		其他 Others	10	0.14
五核苷酸 Penta-nucleotide	11	ACCAGC/CTGGTG	5	0.07
		AGATGG/ATCTCC	4	0.06
		AAAATC/ATTTTG	3	0.04
六核苷酸 Hexa-nucleotide	62	其他 Others	89	1.25



横坐标为 SSR 重复单元长度，纵坐标为该重复单元的重复次数下 SSR 数量。
The horizontal coordinate is the length of the SSR repeat unit and the vertical coordinate is the number of SSRs under the number of repetitions of that repeat unit.

图 5 山东银莲花 SSR 的类型分布

Fig. 5 SSR type distribution of *Anemone shikokiana*

2.3.2 EST-SSR 引物的开发与筛选 利用 1%琼脂糖凝胶电泳对从山东银莲花转录组数据中挑选的 100 对 EST-SSR 引物进行检验，可得 68 对有效扩增引物。为探究 68 对 EST-SSR 引物的多态性，采用 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检验来源于烟台昆嵛山泰礴顶（YD1）、烟台昆嵛山老铁山（YL1）、青岛崂山崂顶景区丹炉峰附近（QD1）、青岛崂山滑溜口（QL1）的山东银莲花 DNA 扩增结果，68 对 EST-SSR 引物均能在上述材料中扩增得到清晰条带，其中有 11 对 EST-SSR 引物具有多态性（表 5），共扩增 24 个多态性片段。以上结果表明，基于山东银莲花转录组数据开发 EST-SSR 引物是一种经济、可行的方法，可通过简单的 PCR 扩增效果验证得出 EST-SSR 引物的稳定性、可重复性和多态性。

表 5 山东银莲花 11 对 EST-SSR 引物信息及扩增结果

Table 5 Information and amplification results of EST-SSR primers of 11 pairs of *Anemone shikokiana*

名称 Primer name	基元 Motif	引物序列 Primer sequence	产物长度 Length of product (bp)	扩增条带数 Number of amplified bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands
ANS003	(A)57	CCAGTTTGGCTATGGGCTGA/GAAGGTGACGGAGCAATGGA	233	4	3
ANS043	(TGA)7	CCGGTTTCAGAAGCAAGCAC/CCCCTCCGGCAATTCTTTCT	239	4	2
ANS046	(T)20	TTCCCTCCTTGAACGTCTGC/AGGCAGTGGAAGCTCTCC	245	7	3
ANS048	(GA)15	GTGATCCGTTCTGACCAGCA/CTTTGGGAAGAACGTTGGCG	122	3	1
ANS059	(TTC)10	TCTAGCCTGAGACGGAAGCT/ACAGACTCCAAAGTAGGCGC	125	4	2

ANS06 0	(A)21	CAGTTGTCTGTGCGTGCAAA/GCTTCACGCGTCGGTTTATC	172	4	2
ANS06 1	(GA)21	GAAACCCGAAGAAGGCCAGA/ATGGATGGCTTGACGGACTG	181	4	2
ANS07 0	(GGA)7	CAGCAGCAGGAGGAAGACAA/GACGGCGACCATCAAACAA G	193	4	2
ANS08 2	(GA)10	CAGCCATGAAGCATGCCATC/ATTGAAACGCCCCGACTTCCT	211	3	1
ANS08 8	(TGG)7	GCAGAGGAGGAGGAGGAAGA/CCACGACCCCCAAACTGAT T	226	2	1
ANS09 7	(CT)14	CGCCTAATGCTAAGCCGGTA/AGGCAGACTACAACAACGGG	163	5	5

3 讨论与结论

3.1 异质生境中山东银莲花的适应机制分析

高通量测序技术能全面快速地获得植物的转录本序列信息，为植物基因发掘和次生代谢物调控等研究提供了巨大便利（Lu et al., 2010）。本研究利用高通量测序技术对异质生境中的山东银莲花进行转录组测序，通过对其差异表达基因进行富集分析，发现山东银莲花适应两种异质生境的机制主要表现在光合作用和类黄酮生物合成两方面。

光合作用作为植物生长和一切代谢活动的生理基础，受光照、水分、温度等不同环境因子的影响（Fang et al., 2022），在其调控过程中捕光复合物 II 叶绿素 a/b 结合蛋白（light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein, LHC）发挥重要作用。LHC 由核基因（*lh*c）编码，具有迅速将光能传到 PS I 和 PS II 反应中心使光能转化为化学能的作用，可以促进光合作用进行（Helena et al., 2023）。*lh*c 基因家族主要包含 *lhca* 和 *lhcb* 两个进化类群，前者编码植物光系统 I 中的 LHC I 膜蛋白，捕光截面较大且可同时捕获光谱中不同波长的光（Mozzo et al., 2010），后者编码植物光系统 II 中的 LHC II 膜蛋白，可结合类囊体膜上 50% 的色素形成叶绿体类囊体中含量最丰富的捕光天线蛋白（王云鹤，2020）。在本研究中发现，相比针阔混交林下生长的山东银莲花，山顶灌丛中的山东银莲花中 *lhca5* 显著上调，与 Ganeteg 等（2004）研究表明 *lhca5* 在强光条件下表达水平显著提高的研究结果一致。同时本研究发现山顶的山东银莲花中 *lhcb1*、*lhcb2* 和 *lhcb3* 显著下调，蒋倩（2019）研究发现在干旱胁迫下水芹的 *lhcb* 基因表达下调可阻止叶绿体接收过多光能，使光合作用减弱，Rahele 等（2022）的研究也表明 *lhcb* 基因表达量的减少导致番茄叶绿素含量降低以响应干旱胁迫，因此可推测 *lhcb1-3* 的下调可减少捕光天线蛋白的合成，减弱光合作用，减少水分的消耗，从而降低干旱对山东银莲花自身产生的影响。山顶灌丛与针阔混交林下比较，光照强、土壤湿度小是最明显的不利于山东银莲花生存的逆境因素，通过本研究表明，*lhca* 和 *lhcb* 两类基因的上调和下调很巧妙的解决了这一难题，适应了山顶灌丛不利的环境，实现非生物胁迫响应。

类黄酮是植物体内广泛存在的次生代谢物质，可吸收 280~315nm 波长的紫外光，保护植物体器官，

尤其是光合组织免受或少受辐射伤害（邹凤莲等，2004），在植物生长发育和热胁迫等非生物胁迫响应过程中发挥多种生理功能（Chen et al., 2023; Guo et al., 2023; Zhuang et al., 2023）。类黄酮生物合成的前体物质来自于苯丙烷代谢，并受一系列关键酶的调控，如查尔酮合成酶（CHS）、查尔酮异构酶（CHI）、黄酮醇合成酶（FLS）、黄酮 3-羟基化酶（F3H）、黄酮 3'-羟基化酶（F3'H）、花色素合成酶（ANS）等（Shen et al., 2022; 戴明洁，2022; Xiong et al., 2016）。本研究发现山顶灌丛的山东银莲花中编码相关酶的基因均较林下显著上调，肖韵铮等（2020）研究表明 *chs* 和 *chi* 基因表达水平与类黄酮含量呈显著正相关关系，表明山顶灌丛中的山东银莲花在生长过程中可以合成较多的类黄酮。山顶灌丛中的强光照，除了可见光，还包括紫外光，同时伴随着午间的高温，长时间的紫外光照射会造成植物 DNA 及其它结构的破坏（Batschauer, 1993），加上高温的影响，对植物将造成重大伤害甚至死亡。本研究山顶灌丛山东银莲花大量类黄酮的合成，可吸收多余的紫外光，减少紫外光对植株的破坏，同时缓解短时间的高温，以适应不良的生活环境。

3.2 山东银莲花的 SSR 位点分析与引物开发

山东银莲花的 SSR 类型相对丰富，从单核苷酸重复序列到六核苷酸重复序列不等。研究表明三核苷酸基序中 AAG/CTT 是主要的基序（Xiang et al., 2023），与本文山东银莲花 SSR 位点分析结果一致，说明 EST-SSR 在其发生和进化过程中具有高度保守性。EST-SSR 分子标记源于功能基因表达序列，具有保守程度高、种间及属间通用性好等优点（娄永峰等，2023）。本研究基于拼接质量较高的转录组数据，利用 SSR 位点设计并合成 100 对引物，其中有 68 对引物可以实现有效扩增，有 11 对引物在不同地域的山东银莲花材料中表现出多态性，具有多态性的 EST-SSR 分子标记可用于遗传多样性分析与分子标记辅助育种。因国内山东银莲花材料稀缺、获取日本四国岛的山东银莲花材料受限，在本研究中未进行相关聚类分析以及系统进化树的构建，后续将通过银莲花属植物对本研究所得的山东银莲花 EST-SSR 多态性引物的通用性进行验证，同时利用挖掘的差异表达基因设计 EST-SSR 引物用于区分不同生境的山东银莲花居群，为其进化研究和种质资源保护奠定基础。

综上所述，本研究对山顶灌丛和针阔混交林下山东银莲花的转录组进行分析，表明其通过调控光合作用途径和类黄酮生物合成途径涉及的基因以适应异质生境，并首次开发多态性较好的 EST-SSR 分子标记，填补山东银莲花在此方面的空白，对其保护与利用具有重要意义。

参考文献：

边境，王晓楠，曹焜，等，2023. 大麻 EST-SSR 遗传结构分析及指纹图谱构建[J]. 植物遗传资源学报：1 - 16[2023-10-20]. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230531001>. [BIAN J, WANG XN, CAO K, et al., 2023. Genetic structure analysis and fingerprint construction of hemp by EST-SSR analysis[J]. J Plant Genet Resour: 1-16[2023-10-20]. <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230531001>.]

- 陈春利, 顾德政, 刘毓, 等, 2018. 山东银莲花组织培养植株再生体系的建立[J]. 江苏农业科学, 46(24): 47–50. [CHEN LC, GU DZ, LIU Y, et al., 2018. Establishment of tissue culture regeneration system of *Anemone shikokiana*[J]. Jiangsu Agric Sci, 46(24): 47–50.]
- 戴明洁, 2022. 桑树类黄酮合成途径关键基因 CHIL 和 F3H 的分子克隆及功能分析[D]. 镇江: 江苏科技大学. [DAI MJ, 2022. Molecular cloning and functional analysis of *CHIL* and *F3H* in flavonoid biosynthesis pathway in mulberry[D]. Zhenjiang: Jiangsu Univ of Sci and Technology.]
- 郭连安, 莫让瑜, 谭均, 等, 2021. 不同产地白术转录组差异表达基因分析[J]. 中药材, 44(12): 2787–2792. [GUO LA, MO RY, TAN J, et al., 2021. Analysis on differential expressed genes in the transcriptome of *Atractylodes macrocephala* from different producing areas[J]. Chin Med Mat, 44(12): 2787–2792.]
- 侯元同, 刘冰, 2010. 山东银莲花[J]. 百科知识, (12): 40. [HOU YT, LIU B, 2010. *Anemone shikokiana*(Makino) Makino[J]. Encyclopedic Knowl, (12): 40.]
- 蒋倩, 2019. 水芹基因组研究及非生物胁迫下的响应因子分析[D]. 南京: 南京农业大学. [JIANG Q, 2019. Genomic analysis and response factors under abiotic stress in *Oenanthe javanica*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University.]
- 李辉, 冯源恒, 唐生森, 等, 2023. 基于转录组测序的枫香 EST-SSR 引物开发及有效性评价[J]. 广西植物, 43(2): 327–335. [LI H, FENG YH, TANG SS, et al., 2023. Development and validity evaluation of *Liquidambar formosana* EST-SSR primers based on transcriptome sequencing[J]. Guihaia, 43(2): 327–335.]
- 刘琼, 2014. 山东银莲花的遗传多样性研究[D]. 济南: 山东师范大学. [LIU Q, 2014. Research on genetic diversity of *Anemone shikokiana*[D]. Jinan: Shandong Normal University.]
- 娄永峰, 甘然, 朱成磊, 等, 2022. 黄秆乌哺鸡竹转录组 EST-SSR 分子标记开发与应用[J]. 植物科学学报, 40(3): 355–364. [LOU YF, GAN R, ZHU CL, et al., 2022. Development and application of EST-SSR markers based on transcriptome of *Phyllostachys vivax* McClure f. *aureocaulis* N. X. Ma[J]. Plant Sci J, 40(3): 355–364.]
- 鲁艳辉, 虞飞博, 郭嘉雯, 等, 2021. 有翅型和无翅型小麦禾谷缢管蚜转录组差异分析[J]. 植物保护学报, 48(6): 1303–1309. [LU YH, YU FB, GUO JH, et al., 2021. Analysis of transcriptomic differences between winged and wingless bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* on wheat[J]. Acta Phytophy Sin, 48(6): 1303–1309.]
- 逢玉娟, 孙维, 王行松, 等, 2022. 土壤异质性对山东银莲花根结构的影响[J]. 烟台大学学报, 35(1): 28–34. [PANG YJ, SUN W, WANG XS, et al., 2022. Influence of soil heterogeneity on root structure of *Anemone shikokiana*[J]. J Yantai Univ, 35(1): 28–34.]

- 孙浩男, 刘冬云, 李明阳, 等, 2022. 基于高通量测序的两色金鸡菊转录组数据分析[J]. 分子植物育种: 1 - 18[2023-10-20].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221017.1205.010.html>. [SUN HN, LIU DY, LI MY, et al., 2022. Transcriptome data analysis of *Coreopsis tinctoria* based on high-throughput sequencing[J]. Mol Plant Breed: 1-18[2023-10-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20221017.1205.010.html>.]
- 田怀志, 郭豪, 田浩, 等, 2022. 水涝胁迫下辣椒转录组特征分析及 EST-SSR 标记开发[J/OL]. 广西植物: 1 - 14[2023-10-20].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20221227.1548.004.html>. [TIAN HZ, GUO H, TIAN H, et al., 2022. Transcriptome characteristics analysis and EST-SSR marker development of *capsicum annuum* under waterlogging stress[J/OL]. Guihaia: 1-14.[2023-10-20].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1134.q.20221227.1548.004.html>.]
- 王妍方, 朱润军, 程希平, 2023. 异质生境下不同径级木棉的表型可塑性研究[J]. 生态科学, 42(3): 61-66. [WANG YF, ZHU RJ, CHENG XP, 2023. Research on phenotypic plasticity of different diameter class *Bombax ceiba* in heterogeneous habitats[J]. Ecol Sci, 42(3): 61-66.]
- 王云鹤, 2020. 苧麻 Lhc 基因的鉴定和表达模式研究[D]. 武汉: 华中农业大学. [WANG YH, 2020. Identification and expression profiling of *Lhc* genes in *Ramie*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University.]
- 王鹭, 逢玉娟, 刘传林, 等, 2014. 稀有植物山东银莲花(*Anemone shikokiana* (Makino) Makino)的分布格局及影响因子分析[J]. 植物研究, 34(4): 440-445. [WANG Z, PANG YJ, LIU CL, et al., 2014. Distribution pattern and analysis of influencing factors of rare plant *Anemone shikokiana* (Makino) Makino[J]. Bot Stud, 34(4): 440-445.]
- 韦陈彬, 谷巍, 田荣, 等, 2022. 基于高通量测序的不同生态环境东方泽泻块茎转录组分析[J]. 中国现代中药, 24(12): 2342-2349. [WEI CB, GU W, TIAN R, et al., 2022. Transcriptomic data analysis of *Alisma orientale* tubers grew in different ecological environments by high-throughput sequencing[J]. Mod Chin Med, 24(12): 2342-2349.]
- 乌日娜, 徐舶, 石凤翎, 2022. 基于转录组数据的直立型扁蓊豆 SSR 序列特征分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 50(5): 1 - 8. [WU RN, XU B, SHI FL, 2022. Analysis of SSR characteristics for *Medicago ruthenica* ‘Zhilixing’ based on transcriptome data[J]. J Northwest A & F Univ (Nat Sci Ed), 50(5): 1 - 8.]
- 肖韵铮, 韩世明, 秦昭, 等, 2020. 滇黄精转录组测序及类黄酮合成相关基因的分析[J]. 河南农业大学学报, 54(6): 931-940. [XIAO YZ, HAN SM, QIN Z, et al., 2020. Analysis of transcriptome sequencing and related genes of flavonoids biosynthesis from *Polygonatum kingianum*[J]. J Henan Agric Univ, 54(6):

931-940.]

- 闫苗苗, 魏光成, 潘效红, 等, 2008. 一种适用于动物与植物总 DNA 提取的方法——改良 CTAB 法[J]. 安徽农业科学, (20): 8488+8558. [YAN MM, WEI GC, PAN XH, et al., 2008. A Method Suitable for Extracting Genomic DNA from Animal and Plant——Modifed CTAB Method Agricultural[J]. J Anhui Agric Sci, (20): 8488+8558.]
- 杨雄, 杨宁, 袁启华, 等, 2021. 白皮松 EST-SSR 分子标记的开发及应用[J]. 北京林业大学学报, 43(7): 111. [YANG X, YANG N, YUAN QH, et al., 2021. Development and application of EST-SSR molecular markers in *Pinus bungeana*[J]. J Beijing For Univ, 43(7): 111.]
- 于文英, 高燕, 逢玉娟, 等, 2019. 山东银莲花叶片形态结构对异质生境和海拔变化的响应[J]. 生态学, 39(12): 4413–4420. [YU WY, GAO Y, PANG YJ, et al., 2019. Response of leaf morphology and structure of *Anemone shikokiana* to heterogeneous habitats and altitude changes[J]. Acta Ecol Sin, 39 (12): 4413–4420.]
- 岳喜元, 岳伟, 严宽, 2023. 黄河三角洲芦苇功能性状对不同水分生境的适应性[J]. 东北林业大学学报, 51(3): 18–21. [YUE XY, YUE W, YAN K, 2023. Adaptation of functional traits of *Phragmites australis* to different water Habitats in the yellow river delta[J]. J NE For Univ, 51(3): 18–21.]
- 岳远灏, 严灵君, 黄犀, 等, 2022. 基于全长转录组测序的南京椴 EST-SSR 标记开发[J]. 分子植物育种: 1–8[2023-10-20].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220715.1525.008.html>. [YUE YH, YAN LJ, HUANG X, et al., 2022. Development EST-SSR markers based on transcriptome sequences of *Tilia miqueliana* Maxim[J]. Mol Plant Breed: 1–18[2023-10-20].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220715.1525.008.html>.]
- 张椿雨, 龙艳, 冯吉, 等, 2007. 植物基因在转录水平上的调控及其生物学意义[J]. 遗传, (7): 793–799. [ZHANG CY, LONG Y, FENG J, et al., 2007. Transcriptional regulation of plant genes and its significance in biology[J]. Hereditas, (7): 793–799.]
- 郑燕, 金谷雷, 吴为人, 2012. 微卫星序列完整性与多态性的关系[J]. 基因组学与应用生物学, 31(6): 587–591. [ZHENG Y, JIN GL, WU WR, 2012. Relationship between sequence completeness and polymorphism of microsatellites[J]. Genom Appl Biol, 31(6): 587–591.]
- 周春苗, 蒋莉萍, 董刚强, 等, 2022. 基于转录组测序研究不同海拔生境神农香菊的基因表达差异[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 24(4): 1356–1368. [ZHOU CM, JIANG LP, DONG GQ, et al., 2022. Analysis of differential expression genes of *Chrysanthemum indicum* var. *aromaticum* associated with different altitude habitats using RNA-seq technology[J]. World Sci Technol-Mod Chin Med, 24(4): 1356–1368.]

- 邹凤莲, 寿森炎, 叶纨芝, 等, 2004. 类黄酮化合物在植物胁迫反应中作用的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, (1): 39–44. [ZOU FL, SHOU SY, Ye ZZ, et al., 2004. Advances in the research on flavonoid biosynthesis and plant stress response[J]. Chin J Cell Biol, (1): 39–44.]
- BATSCHAUER A, 1993. A plant gene for photolyase: an enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage[J]. Plant J, 4(4): 705–709.
- BUCHFINK Benjamin, CHAO Xie, DANIEL H Huson, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND[J]. Nat Methods, 12: 59–60.
- CHEN YY, LU HQ, JIANG KX, et al., 2023. The Flavonoid Biosynthesis and Regulation in *Brassica napus*: A Review[J]. Int J Mol Sci, 24, 357.
- FANG L, MARTRE P, JIN K, et al., 2022. Neglecting acclimation of photosynthesis under drought can cause significant errors in predicting leaf photosynthesis in wheat[J]. Glob Change Biol, 29, 505–521.
- GANETEG U, KIMMEK F, JANSSON S, 2004. Lhca5-an LHC-type protein associated with photosystem I[J]. Plant Mol Biol, 54(5): 641–51
- GHANBARI MSR, TOHIDFAR M, AHMADIKHAH A, 2022. Gene profile analysis and molecular-physiological evaluation of tomato genotypes under drought stress[J]. J Appl Biotechnol Rep, 9(3): 747–62.
- GUO LA, TAN J, DENG XS, et al., 2023. Integrated analysis of metabolome and transcriptome reveals key candidate genes involved in flavonoid biosynthesis in *Pinellia ternata* under heat stress[J]. J Plant Res, 136(3): 359–369.
- HELENA S, MAKIO Y, ATSUSHI T, et al., 2023. Reversible down-regulation of photosystems I and II leads to fast photosynthesis recovery after long-term drought in *Jatropha curcas*[J]. J Exp Bot, 336–351.
- LUCINSK R, JACKOWSKI G, 2006. The structure, functions and degradation of pigment-binding proteins of Photosystem II[J]. Acta Biochim Pol, 53 (4): 693–708.
- MANFRED G, BRIAN J, MORAN Y, et al., 2011. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data[J]. Nat Biotechnol, 29(7): 644.
- MOZZO M, MANTELLI M, PASSARINI F, et al., 2010. Functional analysis of Photosystem I light-harvesting complexes (Lhca) gene products of *Chlamydomonas reinhardtii*[J]. Biochim Biophys Acta, 1797: 212–221.
- PANG YJ, LI LX, BIAN FH, 2020. Photosynthetic and ultrastructural adaptability of *Anemone shikokiana* leaves to heterogeneous habitats[J]. Braz J Bot, 43, 979–988.
- Rozen S, Skaletsky H, 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers[J]. Methods Mol Biol, 132: 365–86.

- SEBASTIAN B, THOMAS T, THOMAS M, et al., 2017. MISA-web: a web server for microsatellite prediction[J]. *Bioinform*, 33(16): 2583–2585.
- SHEN N, WANG TF, GAN Q, et al., 2022. Plant flavonoids: Classification, distribution, biosynthesis, and antioxidant activity[J]. *Food Che*, 132531. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35413752/>.
- SIMON A, WOLFGANG H, 2012. Differential expression of RNA-Seq data at the gene level [J]. EMBL. <https://www.bioconductor.org/help/course-materials/2012/BioC2012/DESeq.pdf>.
- STORF S, STAUBER EJ, HIPPLER M, et al., 2004. Proteomic analysis of the photosystem I light-harvesting antennain tomato (*Lycopersicon esculentum*)[J]. *Biochemistry-USA*, 43(28): 9214–9224.
- TEMNYKH S, DECLERCK G, LUKASHOVA A, 2001. Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential[J]. *Genom Res*, 11(8): 1441–1452.
- XIANG NY, LU BJ, YUAN T, et al., 2023. De Novo transcriptome assembly and EST-SSR marker development and application in *Chrysosplenium macrophyllum*[J]. *Genesis*, 14: 279.
- XIONG S, TIAN N, LONG JH, et al., 2016. Molecular cloning and characterization of a flavanone 3-hydroxylase gene from *Artemisia annua* L.[J]. *Plant Physiol Biochem*, 105(5): 29–36.
- ZHUANG WB, LI YH, SHU XC, et al., 2023. The classification, molecular structure and biological biosynthesis of flavonoids, and their roles in biotic and abiotic stresses[J]. *Molecules*, 28(8): 3599.